



TITLE:

A calcium-binding protein CAS regulates the CO₂-concentrating mechanism in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Wang, Lianyong

CITATION:

Wang, Lianyong. A calcium-binding protein CAS regulates the CO₂-concentrating mechanism in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. 京都大学, 2017, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2017-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20099>

RIGHT:

京都大学	博士（生命科学）	氏名	王 連勇
論文題目	A calcium-binding protein CAS regulates the CO ₂ -concentrating mechanism in the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> （緑藻クラミドモナスにおいてカルシウム結合タンパク質CASはCO ₂ 濃縮機構を制御する）		
（論文内容の要旨） Photosynthetic organisms possess a capacity to sense and respond to various environmental stresses, such as light, CO ₂ , and temperature, to optimize photosynthesis. In particular, aquatic photosynthetic organisms induce a CO ₂ -concentrating mechanism (CCM) to maintain photosynthesis in CO ₂ -limiting stress conditions by sensing the availability of CO ₂ and light. The components of the CCM, including carbonic anhydrases, membrane proteins for inorganic carbon (Ci) uptake, factors associated with the formation of pyrenoid where ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is enriched for CO ₂ -fixation, and proteins for recycling of leaked CO ₂ from pyrenoid, have been identified in the eukaryotic green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . So far, two regulatory factors, CCM1 and LCR1, have also been characterized. CCM1 is a master regulator of the 47 low-CO ₂ (LC, 0.04% CO ₂)-inducible genes, including <i>HLA3</i> encoding a HCO ₃ ⁻ transporter in the plasma membrane, <i>LCIA</i> encoding a possible HCO ₃ ⁻ channel in the chloroplast envelope, and <i>LCR1</i> encoding an LC-inducible DNA-binding transcriptional regulator. However, chloroplast-mediated regulation of the CCM remains to be elucidated. In order to elucidate the regulatory network of CCM, three CO ₂ -requiring mutants have been isolated by gene tagging. In one of the three mutants, a <i>Chlamydomonas</i> ortholog of <i>Arabidopsis</i> chloroplast calcium (Ca ²⁺)-binding protein CAS was disrupted, and this mutant was designated as H82. Introducing a wild-type CAS gene into H82 rescued the defects in growth rate, photosynthetic Ci affinity, internal Ci accumulation, and accumulation of HLA3 and LCIA in LC conditions. The mRNA levels of <i>HLA3</i> and <i>LCIA</i> failed to be maintained in H82 at the increased levels seen in wild-type cells and complemented cells in LC conditions. Additionally, <i>Chlamydomonas</i> CAS possessed a Ca ²⁺ -binding activity <i>in vitro</i> , and the accumulation of HLA3 and LCIA was also impaired by the perturbation of intracellular Ca ²⁺ homeostasis. These results suggest that CAS could control the expression of LC-induced <i>HLA3</i> and <i>LCIA</i> by post-transcriptional regulation in Ca ²⁺ -dependent manner. In response to LC stress in light, most of CAS protein changed its localization from dispersed across the thylakoid membrane to being associated with tubule-like structures in the pyrenoid. This relocation of CAS and the accumulation of HLA3 and LCIA were suppressed by inhibitors of photosynthetic electron transport. Considering the facts that the relocation and accumulation of CAS were not affected by the defect of CCM1, and that the accumulation of CCM1 was not affected in the H82 mutant, CCM1 and CAS could individually function in regulating the expression of <i>HLA3</i> and <i>LCIA</i> in response to CO ₂ and light. These findings suggest that <i>Chlamydomonas</i> CAS regulates CCM and the expression of genes including <i>HLA3</i> and <i>LCIA</i> through a Ca ²⁺ -mediated retrograde signal from the thylakoid in the chloroplast to the nucleus in response to CO ₂ and light.			

(論文審査の結果の要旨)

光合成生物は自らの生存に必要な光合成を、種々の環境ストレスに応じて最適化する能力をもつ。この順化には、環境の変化を感知する機構や、そのシグナルを伝達し、光合成関連タンパク質の発現や機能を制御する機構が存在すると考えられている。特に、水中に生育する光合成生物は、光合成の基質である CO_2 が欠乏する低 CO_2 ストレスに曝されると、 CO_2 濃縮機構 (CCM) を誘導することで光合成を維持する。この CCM の構成要素についてはこれまで、真核微細藻の緑藻クラミドモナスにおいて、炭酸脱水酵素、無機炭素輸送体、リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼが集合したピレノイドの形成に関わるタンパク質、ピレノイドから漏れた CO_2 を再利用するためのタンパク質が特定されている。この CCM を制御する因子として、CCM1 と LCR1 が知られている。CCM1 は、原形質膜の HCO_3^- 輸送体をコードする *HLA3*、葉緑体包膜の HCO_3^- チャネルをコードする *LCIA*、MYB 転写因子をコードする *LCR1* を含む 47 個の低 CO_2 誘導性遺伝子の発現を制御する統括的因子である。しかし、葉緑体タンパク質による CCM の制御は、これまで知られていなかった。

本論文で申請者は、CCM の制御ネットワークを理解するために、 CO_2 要求性変異体を 3 株単離し、その中の 1 株である H82 の変異原因遺伝子が、葉緑体カルシウム (Ca^{2+}) 結合タンパク質 (CAS) をコードすることを突き止めた。低 CO_2 条件での生育、光合成の無機炭素に対する親和性、細胞内への無機炭素の輸送能と *HLA3* と *LCIA* の蓄積が CAS により制御されることを示した。また、CAS が *in vitro* で Ca^{2+} 結合活性をもち、低 CO_2 ストレスに応答する *HLA3* と *LCIA* の初期転写誘導ではなく、転写後の mRNA レベルを維持する役割を持つことを示した。さらに、*HLA3* と *LCIA* の蓄積が、細胞外の Ca^{2+} レベルに依存することを示した。これらの結果から、CCM に必要な輸送体タンパク質 (*HLA3* と *LCIA*) の発現が CAS ならびに Ca^{2+} に依存した制御を受けることを示した。

次に CAS の細胞内局在を調べたところ、光存在下の CO_2 欠乏ストレスに応じて、CAS がチラコイド膜全体からピレノイド内部に移動する事を発見し、この移動と *HLA3* と *LCIA* の蓄積が、光合成の電子伝達に依存することを示した。既知の CCM 制御因子である CCM1 が欠損していても CAS の移動と蓄積が起ること、そして、CAS が欠損していても CCM1 の発現には影響がなかったことから、CAS は CCM1 とは独立に、 CO_2 と光に応じた *HLA3* と *LCIA* の発現維持に働くことを示唆した。

本研究により、水生光合成生物が CO_2 欠乏ストレスに順化する際に、葉緑体に局在する CAS が核に向けて Ca^{2+} 依存的なレトログレードシグナルを発することで、CCM 関連タンパク質の発現を制御することが初めて明らかになった。

本論文では、植物生理学ならびに分子生物学の進展に貢献する独創的な成果が論理的に記載されており、申請者の幅広い学識と緻密な研究を展開する優れた能力が示されている。よって本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認める。さらに、論文内容とそれに関連した口頭試問を平成28年11月15日に行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日